

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/063264 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 31/7115, 48/00, C12N 5/10, A01K 67/027, A61P 37/04
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/017647
- (22) 国際出願日: 2004 年 11 月 19 日 (19.11.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-431007
2003 年 12 月 25 日 (25.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 紙谷 浩之 (KAMIYA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒001-0010 北海道 札幌市 北区北 10 条西 1 丁目 北 10 条グラ
ンドハイツ 402 Hokkaido (JP). 原島 秀吉 (HARASHIMA, Hideyoshi) [JP/JP]; 〒001-0907 北海道 札幌市 北区新琴似 7 条 1 丁目 3 番 35-701 Hokkaido (JP). 土谷 博之 (TSUCHIYA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒001-0013 北海道 札幌市 北区北 13 条西 1 丁目 3-E 1011 Hokkaido (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: IMMUNOPOTENTIATOR AND METHOD OF ENHANCING IMMUNOLOGICAL ACTIVITY WITH THE SAME

(54) 発明の名称: 免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法

(57) Abstract: An immunopotentiator for enhancing the immunological activity of mammals, characterized by containing as an active ingredient a nucleic acid containing a special nucleic acid base, a derivative of the acid, or a plasmid having a nucleic acid containing a special nucleic acid base.

(57) 要約: 哺乳動物の免疫活性を増強させる免疫活性増強剤において、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを有効成分として含有することと特徴とする。



WO 2005/063264 A1

明細書

免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法

5

技術分野

この出願の発明は、免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、この特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを用いた、免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法に関するものである。

10

背景技術

マウスやラット、ウサギ等の哺乳動物における免疫反応は、細菌やウイルス等の微生物、花粉や化学物質等の異物による生体への侵入および感染を防御する重要な生体反応の一つである。この免疫反応のうち、「獲得性免疫」は、これら異物に対して、多様な特異的に結合し無毒化する免疫抗体の働きを主として免疫反

15 応を担っている。また、同じく免疫反応の一種である「自然免疫」は、自己の細胞と異物（たとえば、細菌類の構成成分）との差異を見分けて認識し、この差異に基づいて免疫反応が起こることが、近年報告されている（たとえば、Werling, D., and Jungi, W. T., Vet. Immunol. Immunopathol. 91: 1-12, 2003 および

20 Poltorak, A., et al., Science, 282: 2085-2088, 1998 等）。このような異物の一つとして、細菌由来の DNA に含まれている CpG ジヌクレオチド配列 (CpG 配列) がある（たとえば、Hemmi, H., et al., Nature, 408: 740-745, 2000 および Kreig, A., et al., Nature, 374: 546-549, 1995 等）。

哺乳動物の染色体 DNA において、この CpG 配列は、統計学上で期待できる値と

25 比べて約 1/50 から 1/60 の割合という極めて少ない頻度でのみ含まれており、また、CpG 配列の殆どのシトシン塩基は、CpG 配列に特異的なシトシン 5-メチラーゼにより 5 位がメチル化されている。これに対して、細菌類（微生物）の染色体 DNA に含まれている CpG 配列は、統計学上で期待できる値とほぼ同等の約 1/16

の割合であり、しかも、CpG 特異的なシトシン 5-メチラーゼを持たないため、哺乳動物のようにメチル化シトシンを含まない CpG 配列（非メチル化 CpG 配列）であることが報告されている（たとえば、Bird, A. P., Trends Genet., 3: 342-347, 1987 等）。つまり、哺乳動物の自然免疫系は、この CpG 配列のメチル化、もしくは、非メチル化を認識し、炎症反応が誘起（すなわち、免疫活性の増強）され、その結果、細菌類の侵入や感染から効率よく生体を防御することができる免疫反応であると考えられる。

このような非メチル化 CpG 配列による免疫活性の増強を利用して、自然免疫を刺激する組成物（特表 2 0 0 3 - 5 2 7 3 5 2 号公報）、癌免疫療法（たとえば、Whitmore, M., Li, S., and Huang, L., Gene Ther., 6: 1867-1875, 1999）や感染症に対する効率的な DNA ワクチン（たとえば、特表 2 0 0 2 - 5 1 1 8 4 1 号公報、Brunner, C., et al., J. Immunol. 165: 6278-6286, 2000 および Kojima, Y., et al., Vaccine, 20: 2857-2865, 2002 等）が報告、提案され、その有用性が確認されている。

また、細菌等をはじめとする微生物と哺乳動物における DNA 配列の違いは、この CpG 配列以外にも存在し、たとえば、N⁶-methyladenine (N⁶-メチルアデニン、m⁶A) が挙げられる。たとえば、大腸菌 DNA 中の GATC 配列のアデニン (A) は、このアデニンに対して特異的に作用する酵素である DNA アデニンメチラーゼ (Dam) により、メチル化されて m⁶A となる。発明者らは、非メチル化 CpG 配列だけでなく、この GATC 配列におけるアデニンのメチル化 (Gm⁶ATC 配列) もまた、自然免疫が進化的に保存してきた非自己である異物を認識する機構の一つとして機能していると考えた。また、このような Gm⁶ATC 配列によって、生体において、どのような免疫活性（生体防御反応）が誘起されるのかを研究し、解明することは、将来、大腸菌等の細菌由来のプラスミドを用いた遺伝子治療法等を確立する際に大変重要な知見となると考えられる。

現在のところ、上記の非メチル化 CpG 配列以外の特殊核酸塩基を含む配列による免疫活性（生体防御反応）の誘起や促進、増強に関する研究やその報告は、ほとんどなされていないのが実情である。発明者が知る限りでは、たとえば、上記

の Gm⁶ATC 配列を含む DNA を利用した免疫活性の誘起・増強に関しては、DNA アデニンメチラーゼ (Dam) に影響を及ぼす変異を含ませることにより、弱毒化されたサルモネラ菌等の病原性細菌を用いてワクチン様組成物の作成し、これを生体に投与して免疫効果を上昇させ、病原性細菌の感染の予防や治療に活用することが提案されている (特表 2 0 0 2 - 5 3 6 3 3 9 号公報を参照)。

しかしながら、上記の特表 2 0 0 2 - 5 3 6 3 3 9 号公報記載によるワクチン様組成物は、DNA アデニンメチラーゼの変異を含ませることにより弱毒化させた病原性細菌からなるものであるため、その効果は、このワクチン様組成物の由来となる病原性細菌に対しての免疫活性 (生体防御反応) を上昇させるものであるため、特定の感染症に対してのみ効果を発揮するものであり、生体全体の免疫活性を増強させ、種々の感染症に対しても効果を発揮することができるものではない。つまり、依然として微生物核酸特異的な修飾塩基等をはじめとする特殊核酸塩基を含む核酸、または、その核酸を有するプラスミド等を投与して、免疫活性を誘起、増強させることは知られていない。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、従来の問題点を解消し、特殊核酸塩基を含む核酸、または、そのような塩基を有するプラスミドを有効成分として、哺乳動物に投与することにより、哺乳動物の生体全体の免疫活性を増強させることができ、癌免疫療法や遺伝子治療、種々の感染症に対しても効果的な DNA ワクチン等に応用することができる哺乳動物の免疫活性増強剤およびこれを利用した免疫活性の増強方法を提供することを課題としている。

また、この出願の発明は、上記の免疫活性増強剤を利用して、in vitro における免疫活性の誘起や増強等に関する研究のモデル細胞として、免疫活性が増強されている培養細胞を提供することを課題としており、さらにまた、この出願の発明は、上記の免疫活性増強剤を利用して、in vivo、すなわち生体内で誘起、増強される免疫活性に関する研究のモデル動物として、免疫活性が増強されている非ヒト哺乳動物を提供することも課題としている。

発明の開示

この出願の発明は、上記の課題を解決する手段として、以下の (1) から (19) の発明を提供する。すなわち：

- 5 (1) 哺乳動物の免疫活性を増強させる免疫活性増強剤において、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを有効成分として含有することを特徴とする哺乳動物の免疫活性増強剤；
- (2) 特殊核酸塩基は、8-オキソグアニン、8-オキソアデニン、2-オキソアデニン、5-ヒドロキシウラシル、5-ホルミルウラシル、5-ホルミルシトシン、8-ニトログアニン、チミングリコール、シトシングリコール、ヒポキサンチン、オキザニン、
10 ピリミジンダイマー、0⁶-メチルグアニンおよび 0⁴-メチルチミンからなる群から少なくとも 1 種類が選択される上記 (1) に記載の免疫活性増強剤；
- (3) 特殊核酸塩基は、微生物核酸特異的な修飾塩基である上記 (1) に記載の免疫活性増強剤；
- (4) 微生物核酸特異的な修飾塩基は、N⁶-メチルアデニン、5-ヒドロキシメチルウ
15 ラシルおよび 5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から少なくとも 1 種類が選択される上記 (3) に記載の免疫活性増強剤；
- (5) 微生物核酸特異的な修飾塩基を含む核酸は、配列番号 4 の塩基配列を有する核酸である上記 (3) に記載の免疫活性増強剤；
- (6) 微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸、または、この微生物核
20 酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸を有するプラスミドを有効成分としてさらに含有する上記 (1) から (5) のいずれかに記載の免疫活性増強剤；
- (7) 微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸は、配列番号 2 の塩基配列を有する核酸である上記 (6) に記載の免疫活性増強剤；
- (8) 微生物が、ウイルスまたは細菌である上記 (3) から (7) のいずれかに記載の免
25 疫活性増強剤；
- (9) 細菌が、大腸菌である上記 (8) に記載の免疫活性増強剤；
- (10) 上記 (1) から (9) のいずれかに記載の免疫活性増強剤を培養細胞に投与することによって、培養細胞の免疫活性を増強させて炎症性サイトカインを生産させ

ることを特徴とする炎症性サイトカインの生産方法；

(11) 上記 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(8) および (9) のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を組み込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を培養細胞に同時投与することによって、免疫活性をさらに増強させて炎症性サイトカインを生産させることを特徴とする炎症性サイトカインの生産方法；

(12) 上記 (1) から (9) のいずれかに記載の免疫活性増強剤を培養細胞に投与することによって、免疫活性が増強され、炎症性サイトカインが生産されることを特徴とする培養細胞；

(13) 上記 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(8) および (9) のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を組み込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を培養細胞に同時投与することによって、免疫活性がさらに増強され、炎症性サイトカインを生産されることを特徴とする培養細胞；

(14) 培養細胞が、ヒトを含む哺乳動物由来である上記 (12) または (13) に記載の培養細胞；

(15) 上記 (1) から (9) のいずれかに記載の免疫活性増強剤を哺乳動物に投与することによって、哺乳動物の免疫活性を増強させることを特徴とする哺乳動物の免疫活性の増強方法；

(16) 上記 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(8) および (9) のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を有するプラスミドを有効成分として含有する組成物を哺乳動物に同時投与することによって、哺乳動物の免疫活性をさらに増強させることを特徴とする哺乳動物の免疫活性の増強方法；

(17) 上記 (1) から (9) のいずれかに記載の免疫活性増強剤を非ヒト哺乳動物に投

与することによって、免疫活性が増強されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物；

(18) 上記 (1)、(2)、(3)、(4)、(5)、(8) および (9) のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、

- 5 この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を有するプラスミドを有効成分として含有する組成物を哺乳動物に同時投与することによって、免疫活性がさらに増強されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物；および

(19) 非ヒト哺乳動物が、マウスである上記 (17) または (18) に記載の非ヒト哺乳動物。

- 10 上記のと通りの (1) から (19) のこの出願の発明によって、特殊核酸塩基を含む核酸、または、その核酸を有するプラスミドを有効成分として、哺乳動物に投与することにより、哺乳動物の生体全体の免疫活性を増強させることができ、癌免疫療法や遺伝子治療、種々の感染症に対しても効果的な DNA ワクチン等に応用することができる免疫活性増強剤が提供される。

- 15 また、上記の免疫活性増強剤を利用して、哺乳動物の生体全体の免疫活性を増強させることができる免疫活性の増強方法が提供される。

さらに、上記の免疫活性増強剤を利用して、炎症性サイトカインを効率よく生産させることができる培養細胞およびこの細胞を用いた炎症性サイトカインの生産方法が提供される。

- 20 さらにまた、上記の免疫活性増強剤によって、生体内で誘起、あるいは、増強される免疫活性に関する研究の *in vivo* におけるモデル動物として免疫活性が増強された非ヒト哺乳動物をも提供される。

図面の簡単な説明

- 25 図 1 は、マウスへの Gm⁶ATC 配列または非メチル化 CpG 配列の単独投与の結果である、IL-6 の測定結果を示した図である。

図 2 は、マウスへの Gm⁶ATC 配列または非メチル化 CpG 配列の単独投与の結果である、IL-12 の測定結果を示した図である。

図3は、マウスへの Gm⁶ATC 配列または非メチル化 CpG 配列の単独投与の結果である、TNF- α の測定結果を示した図である。

図4は、マウスへの Gm⁶ATC 配列と非メチル化 CpG 配列との同時投与の結果である、IL-6 の測定結果を示した図である。

5 図5は、マウスへの Gm⁶ATC 配列と非メチル化 CpG 配列との同時投与の結果である、IL-12 の測定結果を示した図である。

図6は、マウスへの Gm⁶ATC 配列と非メチル化 CpG 配列との同時投与の結果である、TNF- α の測定結果を示した図である。

図7は、マウスへの Gm⁶ATC 配列を含むプラスミドの投与の結果である、IL-6
10 および IL-12 の測定結果を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について詳しく説明する。

15 この出願の発明の哺乳動物の免疫活性増強剤は、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、任意のプラスミド中にこの特殊核酸塩基を含む核酸を有しているものを有効成分として含有することを特徴としている。

この出願の発明における「特殊核酸塩基」とは、DNA 成分として特殊な塩基、あるいは、RNA 成分として特殊な塩基等のように、核酸中の成分として、特殊な
20 塩基を意味する。具体的には、たとえば、微生物核酸特異的な修飾塩基等のようなアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル以外の塩基であり、これら特殊な塩基を有する DNA や RNA 等の核酸により、哺乳動物の免疫系が非自己であると区別・認識して、免疫活性を増強・促進させたりすることができるものである。より具体的な例を挙げると、たとえば、ヒドロキシル化、メチル化等の種々
25 の修飾が施された塩基等があり、8-オキソグアニン、8-オキソアデニン、2-オキソアデニン、5-ヒドロキシウラシル、5-ホルミルウラシル、5-ホルミルシトシン、8-ニトログアニン、チミングリコール、シトシングリコール、ヒポキサンチン、オキザニン、ピリミジンダイマー、0⁶-メチルグアニンおよび 0⁴-メチルチミン等

が挙げられる。これらは、単独での使用はもちろん、これら複数を組み合わせて使用してもよい。

また、「プラスミド」は、哺乳動物の細胞中でプラスミドが保有する各遺伝子を発現してもしなくてもよく、その種類は特に限定されるものではないが、たと

5 えば、pQBI63、pcDNA 等を使用することができる。

「微生物核酸特異的な修飾塩基」とは、微生物中に特異的に保有されている、上記のような特殊な塩基のことを意味する。この微生物核酸特異的な修飾塩基によって、哺乳動物の免疫系は、自己（哺乳動物）と非自己（細菌類等の微生物）とを区別・認識して、免疫活性を増強促進させることができる。この微生物核酸
10 に特異的な修飾塩基は、この出願の発明の効果を発揮することのできるものであれば、その種類は特に限定されるものではないが、N⁶-メチルアデニン、5-ヒドロキシメチルウラシル、5-ヒドロキシメチルシトシン等を例示することができ、これらは、単独、または、複数組み合わせ使用してもよい。

特に、微生物核酸特異的な修飾塩基が N⁶-メチルアデニンである場合は、この
15 N⁶-メチルアデニンは、「GATC 配列」を優先的に選択しアデニン (A) の N-6 位をメチル化するため、修飾塩基の修飾対象となる塩基を含む塩基配列は GATC 配列であることが好ましく、具体的には、配列番号 4 に示した塩基配列であることがさらに好ましい。

この微生物核酸特異的な修飾塩基は、たとえば、大腸菌をはじめとする各種の
20 細菌類やウイルス等の微生物から公知の方法によって、単離した天然由来の DNA や RNA 等の核酸を使用することができ、また、たとえば、公知の方法で人工的に修飾塩基を付加した核酸（人工オリゴヌクレオチド）を合成、作成したものを使用することもできる（たとえば、Cowdery, J. S., et al., J. Immunol., 156, 4570-4575, 1996 等）。

25 なお、この出願の発明は、特殊核酸塩基を含む核酸の誘導体を用いることもできる。この「誘導体」とは、化学合成品を用いる場合にリン酸部および糖部が修飾されているものや、塩基部以外の骨格を変換したもの等であり、たとえば、ホスホロチオエート修飾や 2'-O-メチル RNA、ペプチド核酸 (PNA) 等を使用する

ことができる。

さらに、前記のとおり、哺乳動物には、CpG ジヌクレオチド配列 (CpG 配列) をほとんど有しておらず、有していてもこの CpG 配列に特異的なシトシン 5-メチラーゼにより 5 位がメチル化されているため、この差異を生体の免疫系が認識し、免疫活性を増強・誘起させることから、この出願の発明の免疫活性増強剤は、その有効成分として、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸、または、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸を有するプラスミドをさらに含有することにより、哺乳動物の免疫活性をさらに増強させることができる。具体的には、非メチル化 CpG 配列を有する核酸は、たとえば、配列番号 2 に示した塩基配列であることが好ましい。

この出願の発明における「微生物」とは、ウイルスや細菌類であり、特に細菌については、その扱い方法や知見等が豊富に蓄積されている大腸菌であることが好ましい。

この出願の発明は、上記に例示した各免疫活性増強剤を培養細胞に、カチオン性脂質とともに投与方法やマイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法等の公知の方法に従って投与して、培養細胞の免疫活性を増強させて、炎症性サイトカインが効率よく生産することのできる培養細胞を提供することもでき、*in vitro* における免疫活性の実験モデル細胞として使用することができる。また、この培養細胞を利用することにより、効率よく炎症性サイトカインを生産させ、取得することもできる。そして、生産されたこの炎症性サイトカインを公知の方法で抽出、精製等することにより、治療薬剤等の各種用途に使用することができる。

また、免疫活性をさらに増強させるために、上記の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を組み込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を組み合わせて、任意の培養細胞に同時投与してもよい。

なお、「培養細胞」は、その種類や由来等は特に制限されるものではないが、たとえば、生物個体の組織や細胞、具体的には、植物細胞や昆虫細胞、哺乳類細

胞等を使用することができ、また、これらの組織としての構成の各種のものであってもよい。特に、この出願の発明は、哺乳動物の免疫系を増強促進させることから、使用する培養細胞は、ヒトを含む哺乳動物由来であることが好ましい。たとえば、ヒト、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス、ラット、ウサギ等の由来の培養細胞を使用することができる。

さらにまた、この出願の発明は、上記に例示した各免疫活性増強剤を哺乳動物に投与することによって、哺乳動物の免疫活性を増強させることができる、哺乳動物個体の免疫活性の増強方法でもある。

この出願の発明の免疫増強剤を哺乳動物に投与する際には、核酸の状態で投与することもできるが、好ましくは投与形態にあわせて各種の薬理成分を含有させて投与し、免疫活性を増強させる。この「薬理成分」とは、第1には、通常の薬剤製造に用いられる各種の担体を意味する。担体は、対象疾患の種類や薬剤の投与形態に応じて広い範囲から適宜に選択することができるが、経口的にまたは注射により投与しうる単位服用形態にあることが望ましい。特に、注射による投与の場合には、局所注入、腹腔内投与、選択的静脈内注入、静脈注射、皮下注射、臓器灌流液注入等を採用することができる。

懸濁剤およびシロップ剤のような経口液体調製物は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、ゴマ油、大豆油等の油類、アルキルパラヒドロキシベンゾエート等の防腐剤、ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造することができる。

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の表面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製剤化することができる。錠剤やカプセルを製造する際には、固体の製薬担体が用いられる。

また、注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶

液の混合物、各種の緩衝液等からなる担体を用いて製剤化することができる。また粉末状態で製剤化し、使用時に前記液体担体と混合して注射液を調製するようにしてもよい。

- 5 なお、この出願の発明の免疫増強剤の投与量は、投与対象の哺乳動物の体重、
5 症状、投与経路等によって異なることに留意する必要がある。

- 10 薬理成分の第2は、免疫活性増強剤を細胞内に導入可能な形態とするための成分である。たとえば、この免疫活性増強剤の有効成分である微生物の核酸に特異的な修飾塩基を含む核酸、または、これを含むプラスミドの構造や機能を変更することなく、かつ、薬理学的に許容される溶液にこの核酸、または、プラスミド
10 を混合して組成物とすることができる。このような組成物は、たとえば、マイクロインジェクション法により細胞内に導入する方法や、脂質（たとえば、BioPORTER (Gene Therapy Systems 社、米国) 等) やペプチド性試薬（たとえば、Chariot (Active Motif 社、米国) 等) を用いた細胞内導入法、また、金粒子に付着させて遺伝子銃によって標的細胞に導入することもできる。

- 15 さらにまた、上記のとおり、哺乳動物の免疫系は、哺乳動物のメチル化 CpG 配列と微生物特異的な非メチル化 CpG 配列とを区別し、哺乳動物の免疫活性を増強・誘起することから、上記の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸を有するプラスミドを有効成分として含有する組成物を組み合
20 わせて哺乳動物に同時投与することにより、さらに免疫活性を増強させることができる。

そして、この出願の発明における「哺乳動物」とは、ヒトを含むサル、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス、ラット、ウサギ等の哺乳動物を例示することができる。免疫活性増強剤の投与対象とすることができる。

- 25 このように、この出願の発明が提供する哺乳動物の免疫活性増強剤およびこれを用いた免疫活性の増強方法によれば、哺乳動物の免疫活性を増強させることにより、癌免疫療法や遺伝子治療、種々の感染症に対する効果的な DNA ワクチン開発等への応用が期待できる。

さらに、この出願の発明は、上記のとおりの特種核酸塩基を含む核酸、その誘導体、または、その核酸を含むプラスミド等によって、in vivo、すなわち生体内で誘起、あるいは、増強される免疫活性に関する研究のモデル動物として提供することもできるが、この場合は、ヒトを除いた非ヒト哺乳動物であることが重要である。たとえば、サル、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス、ラット、ウサギ等が挙げることができ、特に豊富な知見等が蓄積され、また多くの研究室で実験モデル動物として利用されているマウスとすることが、その扱い易さ等の観点からも好ましい。このような実験モデル動物によって、たとえば、Gm⁶ATC 配列のような特種核酸塩基（修飾塩基）による炎症誘起（免疫活性）のメカニズムの解明に貢献することができる。

以下に、m⁶A を含有または欠損した合成核酸（オリゴヌクレオチド）およびこれを含んだプラスミドを調製し、これら各々を Balb/c マウスに投与し、誘起された炎症反応の強度について炎症性サイトカインを指標にして検討して実施例として示し、さらに詳しく、この出願の発明について説明する。もちろん、以下の例によってこの出願の発明が限定されることはない。

実施例

1. Gm⁶ATC 配列による炎症反応の誘導

(1) Gm⁶ATC 配列と非メチル化 CpG 配列の合成

表 1 に示したホスホロチオエート安定化オリゴヌクレオチド (ODN) は、公知の方法（たとえば、Cowdery, J. S., et al., J. Immunol., 156, 4570-4575, 1996 等）に従い、GATC 配列と Gm⁶ATC 配列、非メチル化 CpG 配列とメチル化 CpG 配列の 4 種類の配列をそれぞれ合成した (Sigma Genosys Japan)。この合成 ODN は、1nmol/ μ l となるように Endotoxine free TE 緩衝液 (QIAGEN 社) に溶解して調製した。次いで、Limulus Amoebocyte Lysate assay (LAL 試験; PYROGENT, BioWhittaker) を行ない、この合成 ODN 溶液中のエンドトキシンの含有量が、0.006EU/ml 以下であることを確認した。

表 1

ODN	Motif	Sequence (5'-3')
GpC-ODN1720	non CpG	TCC ATG <u>AGC</u> TTC CTG ATG CT
CpG-ODN1668	CpG	TCC ATG <u>ACG</u> TTC CTG ATG CT
GATC-dA	non-m ⁶ A	TCC ATG <u>ATC</u> TTC CTG ATG CT
GATC-m ⁶ A	m ⁶ A	TCC ATG <u>m⁶ATC</u> TTC CTG ATG CT

(2) Gm⁶ATC 配列、非メチル化 CpG 配列の投与(i) Gm⁶ATC 配列、非メチル化 CpG 配列の単独投与

- 5 表 1 に示した、GATC-dA (GATC 配列を含む配列)、GATC-m⁶A (Gm⁶ATC 配列を含む配列)、CpG-ODN1668 (非メチル化 CpG 配列を含む配列) および GpC-ODN1720 (メチル化 CpG 配列を含む配列) をそれぞれ 10nmol 採取し 400 μ l の生理食塩水に溶解して、Balb/c マウス (オス、6 週齢 ; 三協ラボサービス) の腹腔内投与し、その 2 時間後に血清中の炎症性サイトカイン (IL-6、IL-12 および TNF- α) の濃度
- 10 を酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA 法 ; AN' ALYZA, Genzyme THCHNE corp.) で測定した。

なお、血清は、投与 2 時間後に、マウスの心臓から採血し、4℃ にて一晩置き、遠心分離処理 (20000g、20 分間、4℃) にて回収した。

- 結果は、図 1 から図 3 に示したとおりである。図 1 は IL-6 における測定値 (pg/ml)、図 2 は IL-12 における測定値 (pg/ml)、図 3 は TNF- α における測定値 (pg/ml) である。なお、図 1 から図 3 に示した結果は、平均値 \pm 標準偏差で示し、図中の米印 2 つは「P<0.01」、米印 3 つは「P<0.005 (n=3 (IL-12)、4 (IL-6、TNF- α)))」を示している。
- 15

- GpC-ODN1720 における測定値は、IL-6:28pg/ml、IL-12:33pg/ml、TNF- α :47pg/ml であり、炎症性サイトカインはほとんど誘導することはなかった。だが、CpG-ODN1668 を投与した場合は、非常に強い炎症性サイトカインが誘導され、その測定値は、IL-6:2.1ng/ml、IL-12:1.0ng/ml、TNF- α :1.5ng/ml であった。
- 20

一方、GATC-dA と GATC-m⁶A との炎症性サイトカインの誘導比較では、GATC-m⁶A は、CpG-ODN1668 の投与の場合よりも若干少なかったものの、GATC-dA よりも有意に誘導されることを確認した。すなわち、GATC-m⁶A の測定値は IL-6 : 39pg/ml、IL-12 : 160pg/ml、TNF- α : 150pg/ml、GATC-dA の測定値は IL-6 : 14pg/ml、IL-12 : 48pg/ml、TNF- α : 92pg/ml であった。このことは、アデニンのメチル化 (m⁶A) により、特異的に炎症性サイトカインが誘導されることを示している。また、非メチル化 CpG 配列において、その前後の配列によって免疫誘導能が異なることが知られている (Kreig, A., et al., Nature, 374: 546-549, 1995 等) ことから、Gm⁶ATC 配列においても、その前後の配列を最適化することにより、Gm⁶ATC 配列の単独投与でも強い免疫誘導効果を期待することができる。

(ii) Gm⁶ATC 配列と非メチル化 CpG 配列との同時投与

微生物由来の DNA(核酸)は、m⁶A だけでなく非メチル化 CpG 配列を含んでいる。たとえば、非ウイルスベクターによる末梢動脈疾患 (peripheral arterial disease) に対する遺伝子治療では、Gm⁶ATC 配列と非メチル化 CpG 配列が含まれたプラスミドを利用している (たとえば、Baumgartner, I., et al., Circulation, 97, p1114-1123, 1998 等)。

そこで、Gm⁶ATC 配列と非メチル化配列を含む CpG-ODN1668 を同時にマウスに投与して、炎症性サイトカインの誘導効果を確認した。Gm⁶ATC、GATC-dA、CpG-ODN1668 のそれぞれの投与量は、5nmol の CpG-ODN1668 に対して、等 mol の Gm⁶ATC または GATC-dA を混合し、400 μ l の生理食塩水に溶解して、これをマウスに投与し、2 時間後にこのマウスの血清中における炎症性サイトカインの測定を ELISA 法で行ない、誘導量を確認した。

結果は、図 4 から図 6 に示したとおりである。図 4 は IL-6 における測定値 (pg/ml)、図 5 は IL-12 における測定値 (pg/ml)、図 6 は TNF- α における測定値 (pg/ml) である。なお、図 4 から図 6 に示した結果は、平均値 \pm 標準偏差 (n=4) で示し、図中の米印 1 つは「P<0.05」、米印 2 つは「P<0.01」、米印 3 つは「P<0.005」を示している。

すなわち、CpG-ODN1668 単独投与の場合は、IL-6 : 530pg/ml、IL-12 : 730pg/ml、

TNF- α : 760pg/ml であった。また、CpG-ODN1668 と GATC-dA との同時投与の場合は、IL-6 : 710pg/ml、IL-12 : 720pg/ml、TNF- α : 1200pg/ml であった。そして、CpG-ODN1668 と Gm⁶ATC との同時投与の場合は、IL-6 : 1600pg/ml、IL-12 : 1100pg/ml、TNF- α : 2900pg/ml と、顕著に高いサイトカイン濃度が誘導されることを確認できた。この濃度は、CpG-ODN1668 単独投与および CpG-ODN1668+GATC-dA の投与と比較して 2-3 倍の濃度であり、m⁶A と非メチル化 CpG 配列がともに存在すると、非常に強く炎症性サイトカインが誘導、増強されることが確認された。

2. Gm⁶ATC 配列を含む核酸（オリゴヌクレオチド）を組み込んだプラスミドによる炎症反応の誘導

10 (1) プラスミドの調製

実際の遺伝子治療で使用するプラスミドを用いて、プラスミドに含まれる Gm⁶ATC 配列によって、誘起される炎症反応を検討した。

プラスミドは、哺乳動物の細胞内では遺伝子発現を行なわないプラスミド pQBI63 を使用した。宿主菌として、メチラーゼ活性を有する大腸菌 DH5 α (dam⁺) とメチラーゼ活性を有さない大腸菌 SCS110 (dam⁻) を用意し、それぞれの大腸菌にプラスミド pQBI63 を公知の方法（たとえば、ヒートショック法やエレクトロポレーション法等）で導入し、Endo free plasmid mega kit (QIAGEN 社) を用いて調製・精製した。

なお、pQBI63 を DH5 α (dam⁺) に導入し調製したものを pQBI63/DH5 α とし、SCS110 (dam⁻) に導入し調製したものを pQBI63/SCS110 とした。調製後のプラスミド pQBI63/DH5 α および pQBI63/SCS110 は、低融点アガロース電気泳動で分取し、その後、QIA-tip100 (QIAGEN 社) または Micropure-EZ (Millipore 社) を用いて精製し、上記 1. (1) と同様に LAL 試験 (PYROGENT、BioWhittaker 社) を行ない、エンドトキシンの含有量が 0.006EU/ml 以下であることを確認した。

25 (2) in vitro でのメチル化反応

上記 (1) により得られた pQBI63/SCS110 を 90 μ g 採取し、120 μ l のメチラーゼバッファー (50mM Tris-HCl、10mM EDTA、5mM 2-メルカプトエタノール (pH 7.5)) 中に入れ、19.2U の Dam メチラーゼ (New England BioLabos Inc.) を用い

て 37℃にて一晩反応させた。この時、メチル基供与体である S-アデノシルメチオニン (SAM; New England BioLabs Inc.) を 80 μ M となるよう添加しアデニンをメチル化したものを pQBI63/SAM+、添加せず mock メチル化体としたものを pQBI63/SAM-とした。反応終了後、pQBI63/SAM+および pQBI63/SAM-を、上記 2.

- 5 (1)と同様に Endo free plasmid mega kit (QIAGEN 社)を用いて精製し、エンドトキシンを除去し、混入を防止した。

(3) プラスミドの投与

- 発明者は、非ウイルスベクターを用いた遺伝子治療において、大腸菌から調製したプラスミドをカチオニック脂質とともに投与する方法は、今後一般的に使用
10 されると考え、この出願の発明におけるプラスミドの投与をカチオニック脂質とともに投与する実施例を一例として示した。

- 上記 2. (1) にて調製した pQBI63/DH5 α および pQBI63/SCS110、また、上記 2. (2) にて調製した pQBI63/SAM+ および pQBI63/SAM-、それぞれをカチオニック脂質 (カチオニックリポソーム) である Lipofectin (Invitrogen 社) と複合体を形成させ、尾静脈よりマウスに投与した。投与 4 時間後、上記と 1. (2) (i)
15 と同様に血清を採集し、この血清中の IL-6 および IL-12 の炎症性サイトカインの濃度 (pg/ml) を ELISA 法にて測定、定量した。

結果は、図 7 に示したとおりであり、平均値 \pm 標準偏差で示し、米印 1 つは「 $P < 0.05$ ($n=3$)」を示している。

- 20 まず、IL-12 における測定結果は、pQBI63/DH5 α によって、420pg/ml まで誘導されたのに対して、pQBI63/SCS110 を投与することによって、IL-12 の誘導が 140pg/ml に低下した。

- つぎに、pQBI63/SCS110 を S-アデノシルメチオニンの存在下で Dam 処理を行ない、アデニンをメチル化した pQBI63/SAM+ を投与することにより、IL-12 は、
25 pQBI63/DH5 α と同程度の 320pg/ml に誘導された。また、S-アデノシルメチオニンの非存在下で Dam 処理を行なった pQBI63/SAM- の場合は、pQBI63/SCS110 と同程度の 140pg/ml を誘導した。

そして、IL-6 の測定結果は、IL-12 ほど強い誘導は確認されなかったが、その

傾向は IL-12 とほぼ同様であったことを確認された。つまり、Gm⁺ATC 配列によって炎症反応が誘導、増強されること示すものである。

なお、コントロールである Lipofectin の単独投与時の IL-12 および IL-6 それぞれの血清中濃度は、検出限界値以下 (<7.8pg/ml) であった。

5

産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、特殊核酸塩基を含む核酸、または、この特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを用いた、免疫活性増強剤とこれを用いた免疫活性の増強方法が提供され、免疫活性のメカニズム

10 の解明や癌免疫療法や種々の感染症に対しても効果的な DNA ワクチン開発等への応用に期待することができる。

請求の範囲

1. 哺乳動物の免疫活性を増強させる免疫活性増強剤において、特殊核酸塩基を含む核酸もしくはその誘導体、または、特殊核酸塩基を含む核酸を有するプラスミドを有効成分として含有することを特徴とする哺乳動物の免疫活性増強剤。
5
2. 特殊核酸塩基は、8-オキソグアニン、8-オキソアデニン、2-オキソアデニン、5-ヒドロキシウラシル、5-ホルミルウラシル、5-ホルミルシトシン、8-ニトログアニン、チミングリコール、シトシングリコール、ヒポキサンチン、オキザニン、ピリミジンダイマー、0⁶-メチルグアニンおよび0⁴-メチルチミンからなる
10 群から少なくとも1種類が選択される請求項1に記載の免疫活性増強剤。
3. 特殊核酸塩基は、微生物核酸特異的な修飾塩基である請求項1に記載の免疫活性増強剤。
4. 微生物核酸特異的な修飾塩基は、N⁶-メチルアデニン、5-ヒドロキシメチルウラシルおよび5-ヒドロキシメチルシトシンからなる群から少なくとも1種類
15 が選択される請求項3に記載の免疫活性増強剤。
5. 微生物核酸特異的な修飾塩基を含む核酸は、配列番号4の塩基配列を有する核酸である請求項3に記載の免疫活性増強剤。
6. 微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸、または、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸を有するプラスミドを有効成分としてさ
20 らに含有する請求項1から5のいずれかに記載の免疫活性増強剤。
7. 微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を含む核酸は、配列番号2の塩基配列を有する核酸である請求項6に記載の免疫活性増強剤。
8. 微生物が、ウイルスまたは細菌である請求項3から7のいずれかに記載の免疫活性増強剤。
- 25 9. 細菌が、大腸菌である請求項8に記載の免疫活性増強剤。
10. 請求項1から9のいずれかに記載の免疫活性増強剤を培養細胞に投与することによって、培養細胞の免疫活性を増強させて炎症性サイトカインを生産させることを特徴とする炎症性サイトカインの生産方法。

1 1. 請求項 1、2、3、4、5、8 および 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を組み込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を培養細胞に同時投与することによって、免疫
5 活性をさらに増強させて炎症性サイトカインを生産させることを特徴とする炎症性サイトカインの生産方法。

1 2. 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤を培養細胞に投与することによって、免疫活性が増強され、炎症性サイトカインが生産されることを特徴とする培養細胞。

10 1 3. 請求項 1、2、3、4、5、8 および 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を組み込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を培養細胞に同時投与することによって、免疫
15 活性がさらに増強され、炎症性サイトカインを生産されることを特徴とする培養細胞。

1 4. 培養細胞が、ヒトを含む哺乳動物由来である請求項 1 2 または 1 3 に記載の培養細胞。

1 5. 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤を哺乳動物に投与することによって、哺乳動物の免疫活性を増強させることを特徴とする哺乳動物の
20 免疫活性の増強方法。

1 6. 請求項 1、2、3、4、5、8 および 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を組み込んだプラスミドを有効成分として含有する組成物を哺乳動物に同時投与することによって、哺乳
25 動物の免疫活性をさらに増強させることを特徴とする哺乳動物の免疫活性の増強方法。

1 7. 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の免疫活性増強剤を非ヒト哺乳動物に投与することによって、免疫活性が増強されていることを特徴とする非ヒト哺乳

動物。

18. 請求項1、2、3、4、5、8および9のいずれかに記載の免疫活性増強剤とともに、微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸、または、この微生物核酸特異的な非メチル化 CpG 配列を有する核酸を組み込んだプラスミド
- 5 を有効成分として含有する組成物を哺乳動物に同時投与することによって、免疫活性がさらに増強されていることを特徴とする非ヒト哺乳動物。

19. 非ヒト哺乳動物が、マウスである請求項17または18に記載の非ヒト哺乳動物。

図1

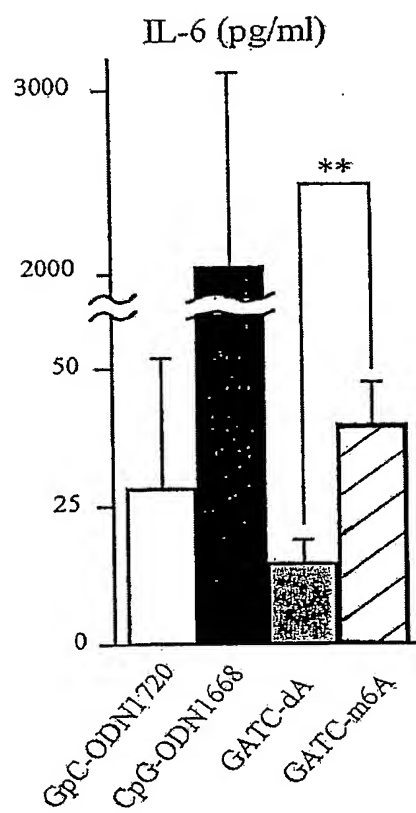


図 2

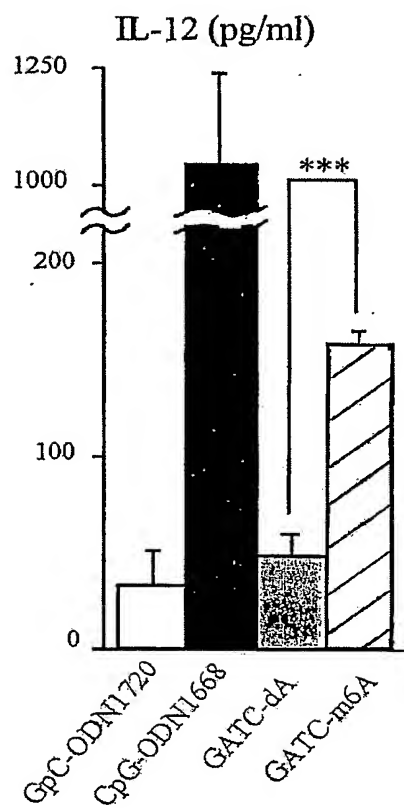


図3

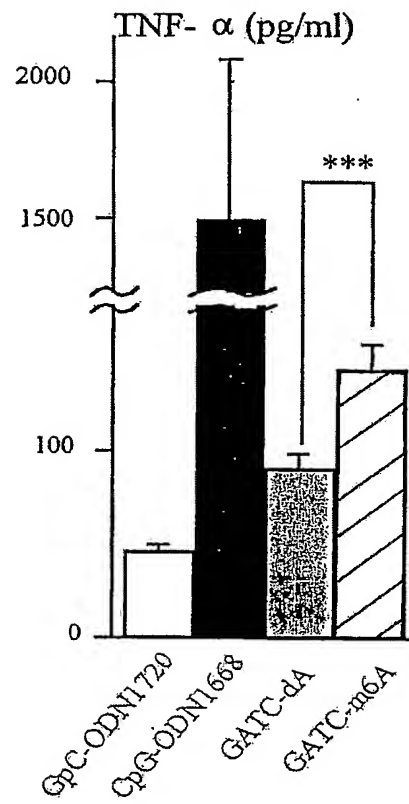


図4

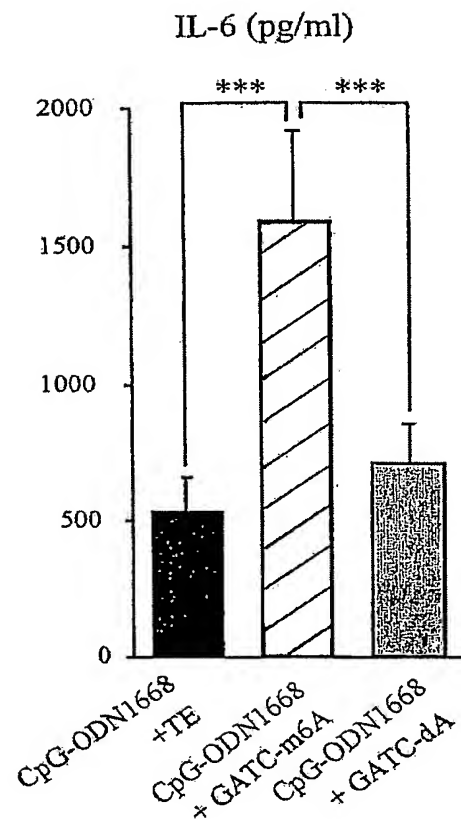


図5

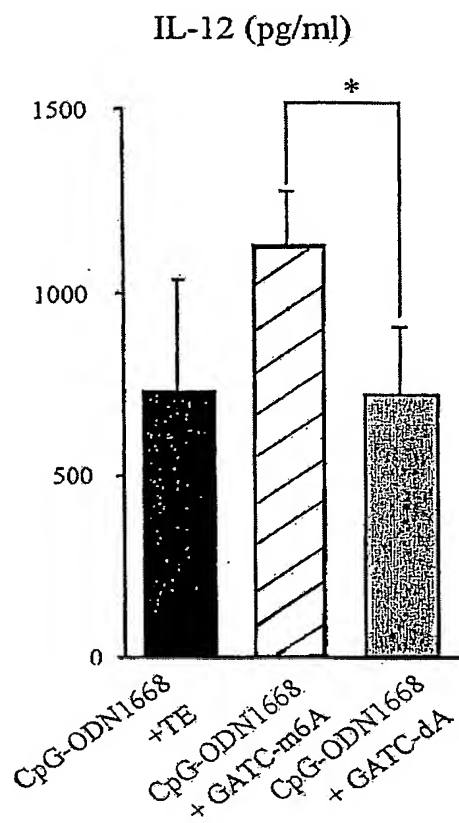


図6

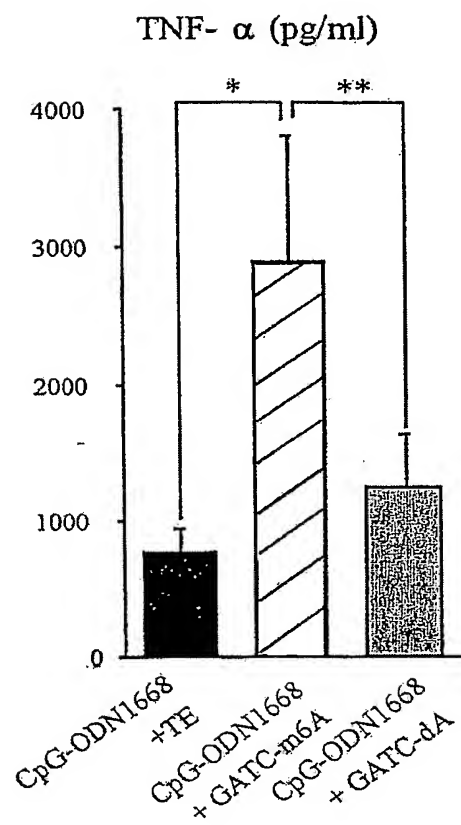
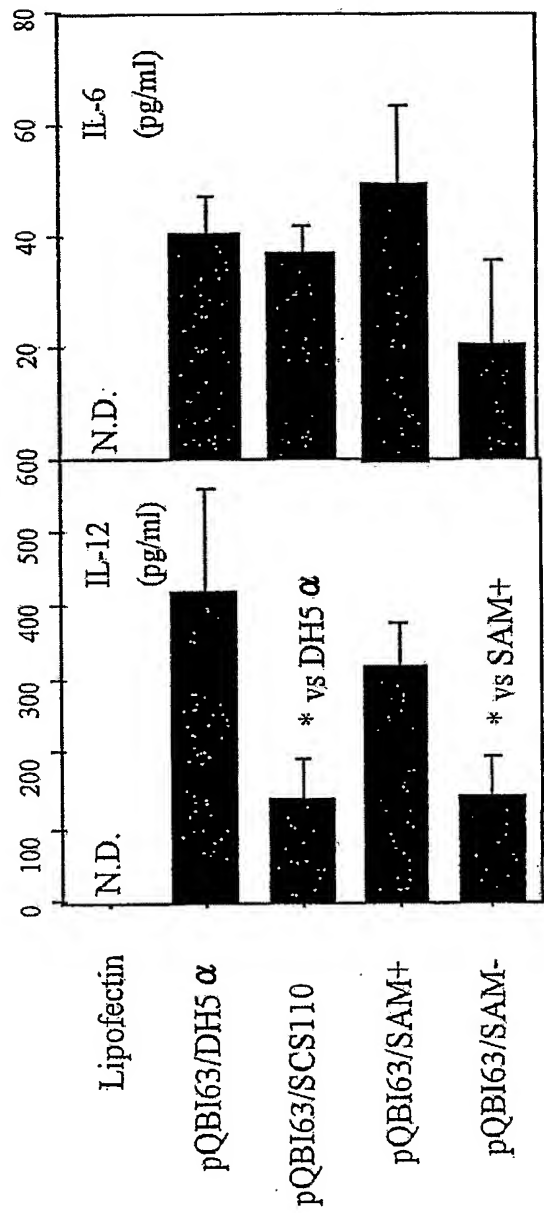


図 7



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Immunity activity reinforcement agent

<130> NP03416-JN

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GpC-ODN1720, the motif is "non-CpG"

<400> 1

tccatgagct tcctgatgct

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CpG-ODN1668, the motif is "CpG"

<400> 2

tccatgacgt tcctgatgct

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GATC-dA, the motif is "non-m6A"

<400> 3

tccatgatct tcctgatgct

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> n=N6-methyladenin (m6A)

<223> GATC-m6A, the motif is "m6A"

<400> 4

tccatgntct tcctgatgct

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017647

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/7115, 48/00, C12N5/10, A01K67/027, A61P37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/7115, 48/00, C12N5/10, A01K67/027, A61P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS (STN), JMEDPLUS (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2002/026757 A2 (HYBRIDON INC), 04 April, 2002 (04.04.02), Full text & JP 2004-509970 A	1-5, 8, 9, 17, 19 6, 7, 10-14, 18
X Y	JP 2003-535146 A (Intatsueru AG), 15 November, 2003 (15.11.03), Full text & WO 01/93905 A1	1-5, 8, 9, 17, 19 6, 7, 10-14, 18
X Y	JP 09-323979 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 16 December, 1997 (16.12.97), Claims 1 to 9 (Family: none)	1, 2, 17, 19 6, 7, 18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 December, 2004 (17.12.04)

Date of mailing of the international search report
11 January, 2005 (11.01.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017647

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 3-135918 A (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), 10 June, 1991 (10.06.91), Claim 1 (Family: none)	1, 17, 19 6, 7, 18
Y	Brunner C. et al., 'Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo.', J.Immunol., 01 December, 2000 (01.12.00); 165(11):6278-86.	10-14
Y	JP 10-506265 A (University of Iowa Research Foundation), 23 June, 1998 (23.06.98), Full text & WO 96/02555 A1	6, 7, 11, 13, 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/017647

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15, 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 15 and 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ A61K31/7115, 48/00, C12N5/10, A01K67/027,
A61P37/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ A61K31/7115, 48/00, C12N5/10, A01K67/027,
A61P37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/EMBASE/BIOSIS(STN) JMEDPLUS(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2002/026757 A2 (HYBRIDON INC)	1-5, 8, 9, 17,
Y	2002. 04. 04, 全文, & JP 2004-509970 A	19
X	JP 2003-535146 A (インターツェル・アクチエンゲゼルシャフト)	1-5, 8, 9, 17,
Y	2003. 11. 15, 全文, & WO 01/93905 A1	19
X	JP 09-323979 A (明治乳業株式会社)	1, 2, 17, 19
Y	1997. 12. 16, 請求項1-9 (ファミリーなし)	6, 7, 18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 12. 2004

国際調査報告の発送日

11. 1. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

川口 裕美子

4C

9829

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P 3-135918 A (株式会社大塚製薬工場)	1, 17, 19
Y	1991. 06. 10, 請求項1 (ファミリーなし)	6, 7, 18
Y	Brunner C et al. 'Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo.' J Immunol. 2000 Dec 1;165(11):6278-86.	10-14
Y	J P 10-506265 A (サニバーシティ オブ アイワ リサーチ ファウンデーション) 1998. 06. 23, 全文, & WO 96/02555 A1	6, 7, 11, 13, 18

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15, 16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 15, 16 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。